



TITLE:

マウス胚を用いた後腎初期発生におけるレチノイン酸応答遺伝子の解析(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

高山, 真美

CITATION:

高山, 真美. マウス胚を用いた後腎初期発生におけるレチノイン酸応答遺伝子の解析. 京都大学, 2015, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2015-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19141>

RIGHT:

京都大学	博士（生命科学）	氏名	高山 真美
論文題目	マウス胚を用いた後腎初期発生におけるレチノイン酸応答遺伝子の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>哺乳類の腎臓である後腎の発生は、上皮管である尿管芽が後腎間葉へ伸長、侵入することで開始する。後腎間葉はその後、尿管芽を取り囲むキャップ状間葉とその外側を囲む間質細胞に分化し、尿管芽はそれらと相互作用して、分岐形態形成を起こす。この過程には、多様なシグナル伝達経路が協調して働くことが知られている。その中で、尿管芽の突出とその後の分岐形態形成で、重要な役割を果たすシグナル経路のひとつにレチノイン酸 (RA) シグナル経路がある。しかし、腎臓において RA シグナル経路が転写制御している遺伝子について、これまで詳細な解析は行なわれていなかった。本研究で申請者は、腎発生初期に RA によって発現が誘導される新規遺伝子を同定するため、マウス胚から摘出した腎臓を単離し、培養する <i>in vitro</i> 培養系を立ち上げた。そして、マイクロアレイを用いて、単離培養した腎臓における網羅的遺伝子発現解析を行なった。その結果、RA の添加によって発現量が上昇する遺伝子を 33 個同定した。また、RAR アンタゴニストの添加によって、同定した RA 応答候補遺伝子の多くで、発現量が減少することを示した。RA 応答候補遺伝子の転写を制御する共通の転写因子を調べるため、転写開始点上流についてプロモーター解析を行ない、転写因子の候補として Elf5 を見出した。Elf5 は RA 応答候補遺伝子として同定した 33 個の中にも含まれており、Elf5 が RA によって誘導され多数の遺伝子の転写制御に関与する可能性が示唆された。つづいて、Elf5 に加えて他の RA 応答遺伝子の中から 4 つの遺伝子、上皮性ナトリウムチャネルのサブユニットである Scnn1b, 分泌糖タンパク質 Ecm1, サイトカイン Tnfsf13b, IL-33に着目した。これらの遺伝子の発現場所を調べるため、単離培養した腎臓を用いたホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション実験を行なった。Elf5 と Scnn1b はそれぞれ尿管芽枝幹部分で、Ecm1, Tnfsf13b ならびに IL-33 はそれぞれ間質細胞で、RA によって発現が誘導されていた。Tnfsf13b と IL-33 はどちらも下流で NF-κB (nuclear factor κB) を活性化することが知られている。そこで申請者は単離した腎臓を、NF-κB シグナル伝達経路を阻害する 2 種類のインヒビターをそれぞれ加えて培養した。すると、どちらのインヒビターを加えた場合も、尿管芽の分岐形態形成が著しく阻害され、尿管芽先端を取り囲むキャップ状間葉が消失した。以上のように本研究で申請者は、マウス胚の腎臓の <i>in vitro</i> 培養系を立ち上げ、この培養系を用いて腎臓の初期発生における複数の RA 応答遺伝子の同定を行ない、NF-κB シグナル伝達経路の尿管芽分岐形態形成への関与を明らかにした。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者はマウス後腎のin vitro培養系を用いて後腎初期発生におけるレチノイン酸(RA)シグナル経路の複数の下流遺伝子を同定し、NF-κB シグナル伝達経路が後腎初期発生に関与することを示した。後腎の発生は尿管芽、キャップ状間葉、間質細胞の相互作用によって進行し、RAシグナル経路がその過程において重要であることが知られている。しかしながら、RAシグナル経路によって制御される遺伝子について詳細な解析は行なわれておらず、不十分であった。申請者は、マウス胚から単離した後腎を培養するin vitro培養系において、RA添加により発現が誘導される遺伝子をマイクロアレイによって網羅的に解析した。その結果、RA応答候補遺伝子33個を同定した。RA応答候補遺伝子の転写を制御する共通の転写因子について調べるため、プロモーター解析を行ない、申請者が同定したRA応答遺伝子のひとつであった転写因子Elf5の結合配列が有意に濃縮されていることを見出した。そこでElf5の発現場所をホールマウントin situ ハイブリダイゼーションによって調べ、将来集合管となるべき部位である尿管芽枝幹部分に発現していることを示した。またその発現が、RAによって誘導されることを示した。さらに、RA応答遺伝子として申請者が同定した集合管マーカー遺伝子Scnn1bについても、ホールマウントin situ ハイブリダイゼーションを行ない、Scnn1bが尿管芽枝幹部分に発現し、RAによって発現が誘導されることを示した。つづいて申請者は、他のRA応答遺伝子の中からEcm1, Tnfsf13bならびにIL-33に着目し、それぞれについてホールマウントin situ ハイブリダイゼーションを行なった。その結果、いずれの遺伝子も後腎の間質細胞に発現し、RAによって発現が誘導されることを示した。申請者は、分泌因子であるTnfsf13とIL-33が下流でNF-κBシグナル伝達経路を活性化することに着目し、NF-κBシグナル伝達経路が後腎の発生に関与すると予想した。そして、NF-κBシグナル伝達経路を阻害する2種類のインヒビターを用いてin vitro培養系での腎発生への影響を解析した。その結果、いずれのインヒビターも、添加することにより尿管芽分岐形態形成を阻害し、尿管芽先端のキャップ状間葉が消失するという重篤な表現型を引き起こすことを見出した。これら一連の申請者の研究は、後腎初期発生におけるRAシグナル経路とNF-κBシグナル伝達経路の関与に関する研究の進展に寄与するものである。これら一連の研究において、申請者の生命科学に関する高い知識と専攻分野における優れた研究能力が示されている。また本論文は、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見について論じたものであり、論理的かつ一貫性を持って記述されている。以上より、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成27年1月27日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行なった結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日